

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002年7月4日 (04.07.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/052027 A1(51) 国際特許分類?: C12P 7/42,  
11/00, 13/02 // (C12P 7/42, C12R 1:06) (C12P 11/00,  
C12R 1:06) (C12P 13/02, C12R 1:06)一 (KOBAYASHI, Yoichi) [JP/JP]. 横山雅裕  
(YOKOYAMA, Masahiro) [JP/JP]; 〒250-0216 神奈川県小田原市高田345 日本曹達株式会社 小田原研究所内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/09138

(74) 代理人: 東海裕作, 外 (TOKAI, Yusaku et al.); 〒100-8165 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 日本曹達株式会社内 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2000年12月22日 (22.12.2000)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本曹達株式会社 (NIPPON SODA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8165 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 Tokyo (JP).

/続葉有]

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 早川  
公一 (HAYAKAWA, Koichi) [JP/JP]. 小林 洋

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING SUBSTANCE BY USING MICROBIAL CATALYST

(54) 発明の名称: 微生物触媒を用いた物質生産方法

(57) Abstract: An industrially advantageous process for producing a substance wherein the production speed of a reaction product in a reaction with the use of a microbial catalyst can be maintained at a constant level over a long period of time. In a reaction with the use of a microbial catalyst (for example, resting cells of an arthrobacter capable of converting  $\alpha$ -hydroxynitriles into the corresponding  $\alpha$ -hydroxy acid amides or  $\alpha$ -hydroxy acid ammonium salts), the substance is produced at a constant speed by adding the substrate at a constant speed, regulating the concentration of the microbial catalyst in the liquid reaction mixture at a constant level and controlling the temperature so as to rise the reaction temperature at the point that the enzymatic activity of the microbial catalyst is lowered in the course of the reaction so as to maintain the reaction speed at a constant level.

(57) 要約:

本発明は、微生物触媒を用いた反応において、反応生成物の生産速度を長期間一定にできる、工業的に有利な物質生産方法を提供することを目的とする。

$\alpha$ -ヒドロキシトリル類を相当する  $\alpha$ -ヒドロキシ酸アミド類や  $\alpha$ -ヒドロキシ酸アンモニウム塩に変換しうるアースロバクター属等の休止菌体などの微生物触媒を用いた反応において、一定速度で基質を添加し、微生物の触媒の反応液中濃度を一定とし、反応中に微生物触媒の酵素活性が低下した時点で反応温度を上昇させ反応速度を一定に保持するという昇温コントロールを実施することにより、一定速度で物質生産を行う。

WO 02/052027 A1



LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

## 明細書

## 微生物触媒を用いた物質生産方法

## 技術分野：

本発明は、微生物触媒を用いた $\alpha$ -ヒドロキシ酸アンモニウム塩等の有用な化学物質を一定速度で生産する方法に関する。

## 背景技術：

従来、微生物触媒を用いた物質生産において、生産速度を一定に維持する方法として、新鮮な微生物触媒を追加する方法が知られている (Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, VCH, 1995, p148)。

他方、 $\alpha$ -ヒドロキシトリル類から微生物によって $\alpha$ -ヒドロキシ酸アンモニウム塩又は $\alpha$ -ヒドロキシ酸を製造する方法も知られている (特公昭58-15120号公報、特開昭63-222696号公報、特開昭64-10996号公報、特開平4-40897号公報、特開平4-40898号公報、特表平10-507631号公報等)。

## 発明の開示：

工業的に物質生産を行う上で、反応槽あたりの生産量を一定に維持することは、製品の安定出荷、反応コントロールの簡便さという点で、きわめて有利である。一方、微生物触媒を用いた連続反応においては、反応槽と分離機を組み合わせた反応装置が用いられ、微生物触媒を連続的に回収して再使用すると同時に、生成物を分離ろ液として連続排出する方式が採用されている。微生物触媒は連続使用すると一般にその活性が徐々に低下するため、生産速度を一定に維持するためには、従来、新鮮な微生物触媒を追加する方法が採用されていた。しかし、微生物触媒の製造コストは一般に高価であり、新たな微生物触媒の追加使用は好ましくない。また、微生物触媒の追加により反応槽の微生物触媒濃度が上昇すると、分離機の負担が増加し、反応をコントロールする上で問題がある。

本発明の課題は、微生物触媒を用いた反応において、反応生成物の生産速度を長期間一定にできる、工業的に有利な物質生産方法を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究し、微生物触媒の温度に対する活性変化を詳しく解析した結果、微生物触媒を初期添加量のみの所定濃度としたまま、基質を一定速度で連続的に添加し、生成物を一定速度で生産する昇温コントロール法を見い出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、微生物触媒を用いた反応において、反応温度を昇温コントロールすることにより、一定速度で物質生産を行うことを特徴とする微生物触媒を用いた物質生産方法や、微生物触媒を用いた反応において、微生物触媒の基質を一定速度で添加し、反応温度を昇温コントロールすることにより、一定速度で物質生産を行うことを特徴とする微生物触媒を用いた物質生産方法に関する。

また本発明は、微生物触媒の反応液中の濃度が一定であることを特徴とする上記微生物触媒を用いた物質生産方法や、微生物触媒の反応液中の濃度を一定とするために、反応槽から排出した反応液中の微生物触媒を分離回収し、再度反応槽に戻すことを特徴とする上記微生物触媒を用いた物質生産方法や、昇温が5～25℃から選択される温度範囲であることを特徴とする上記微生物触媒を用いた物質生産方法や、微生物触媒がニトリラーゼ発現微生物触媒であることを特徴とする上記微生物触媒を用いた物質生産方法や、ニトリラーゼ発現微生物がアースロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物であることを特徴とする上記微生物触媒を用いた物質生産方法に関する。

さらに本発明は、微生物触媒を用いた反応が、ニトリル化合物を微生物の触媒作用により水性溶媒中で加水分解して、アミド化合物、又はカルボン酸ないしはそのアンモニウム塩に変換することを特徴とする上記の微生物触媒を用いた物質生産方法に関し、さらに詳しくは、微生物触媒を用いた反応が、一般式  $RCN$  (式中、Rは、水素原子、置換基を有してもよい $C_1$ ～ $C_6$ のアルキル基、置換基を有してもよい $C_2$ ～ $C_6$ のアルケニル基、置換基を有してもよいアリール基、又は置換基を有してもよい複素環基を示す。) で表されるニトリル化合物を、微生物の触媒作用により水性溶媒中で加水分解して、一般式  $RCO NH$

<sub>2</sub>(式中、Rは前記と同一の意味を示す。)で表されるアミド化合物、又は一般式 R COOH (式中、Rは前記と同一の意味を示す。)で表されるカルボン酸ないしはそのアンモニウム塩化合物に変換する反応であることを特徴とする上記の微生物触媒を用いた物質生産方法や、微生物触媒を用いた反応が、一般式 R' CH (OH) CN (式中、R'は、水素原子、置換基を有してもよいC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>のアルキル基、置換基を有してもよいC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>のアルケニル基、置換基を有してもよいC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>のアルコキシ基、置換基を有してもよいアリール基、置換基を有してもよいアリールオキシ基又は置換基を有してもよい複素環基を示す。)で表されるα-ヒドロキシトリル化合物を微生物の触媒作用により水性溶媒中で加水分解して、一般式 R' CH (OH) CONH<sub>2</sub> (式中、R'は前記と同一の意味を示す。)で表されるα-ヒドロキシ酸アミド化合物、又は一般式 R' CH (OH) COOH (式中、R'は前記と同一の意味を示す。)で表されるα-ヒドロキシ酸アミド化合物、又は一般式 R' CH (OH) COOCH<sub>2</sub> (式中、R'は前記と同一の意味を示す。)で表されるα-ヒドロキシ酸アミド化合物、又は一般式 R' CH (NH<sub>2</sub>) CN (式中、R'は、水素原子、置換基を有してもよいC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>のアルキル基、置換基を有してもよいC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>のアルケニル基、置換基を有してもよいC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>のアルコキシ基、置換基を有してもよいアリール基、置換基を有してもよいアリールオキシ基又は置換基を有してもよい複素環基を示す。)で表されるα-アミノニトリル化合物を微生物の触媒作用により水性溶媒中で加水分解して、一般式 R' CH (NH<sub>2</sub>) CONH<sub>2</sub> (式中、R'は前記と同一の意味を示す。)で表されるα-アミノアミド化合物、又は一般式 R' CH (NH<sub>2</sub>) COOH (式中、R'は前記と同一の意味を示す。)で表されるα-アミノ酸ないしはそのアンモニウム塩化合物に変換する反応であることを特徴とする上記の微生物触媒を用いた物質生産方法に関する。

本発明の微生物触媒を用いた物質生産方法は、微生物触媒を用いた反応において、反応温度を昇温コントロールすることにより、好ましくは、微生物触媒の基質を一定速度で添加し、微生物触媒の反応液中の濃度を一定とし、反応温度を昇温コントロールすることにより、一定速度で物質生産を行うことを特徴とする。

本発明において微生物触媒とは、ニトリラーゼ活性をはじめとする加水分解酵素活性、酸化還元酵素活性、転移酵素活性、異性化酵素活性、分裂酵素活性、結合酵素活性等の酵素活性を有する微生物由来のものであればどのようなものでもよく、微生物菌体や、固定化微生物、粗酵素、固定化酵素等の微生物処理物を例示することができる。また、微生物触媒が微生物菌体や固定化微生物などの場合、生菌体であっても死菌体であっても特に限定されるものではない。

かかる微生物触媒としては、微生物触媒の酵素活性低下率と反応速度の温度依存率との関係において、昇温による反応速度の上昇率が活性低下率を上回る微生物触媒が好ましく、その具体例としては、 $\alpha$ -ヒドロキシトリル類を相当する $\alpha$ -ヒドロキシ酸アンモニウム塩に変換しうるアースロバクター (Arthrobacter) sp. NSSC104 (FERM P-15424) の休止菌体を挙げることができる。

また、微生物触媒における微生物としては、上記アースロバクター sp. NSSC104 以外のアースロバクター属に属する微生物や、カゼオバクター (Caseobacter) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、ノカルジア (Nocardia) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、ゴルドナ (Gordona) 属、バチルス (Bacillus) 属、バクテリジウム (Bacteridium) 属、ミクロコッカス (Micrococcus) 属、アシネットバクター (Acinetobacter) 属に属する微生物を例示することができる。

本発明に用いる基質となる化合物は、各微生物触媒が行う反応に用いることができるものであれば特に制限はない。

本発明において一般式  $R\text{C}\text{N}$ 、 $R'\text{CH}(\text{OH})\text{C}\text{N}$ 、または  $R''\text{CH}(\text{NH}_2)\text{C}\text{N}$ において、 $R$ 、 $R'$ 、 $R''$  のそれぞれの置換基が有していてもよい置換基としては、水酸基、メルカプト基、カルボキシ基、カルバモイル基、カルバミジノ基、水酸基等で置換されていてもよいフェニル基、インドリル基、イミダゾリル基、C1～C6のアルキルチオ基、C2～C6のアルケニル基、C1～C6のアルコキシ基、アリールオキシ基、ベンジル等のアラルキル基を挙げることができる。

本発明に関するニトリル化合物としては、各種  $\alpha$ -アミノ酸、またはその類縁体である  $\alpha$ -ヒドロキシ酸のそれぞれに対応するニトリル化合物を挙げができる。

具体的なニトリル化合物としては、アセトニトリル、プロピオニトリル、n-ブチロニトリル、i-ブチロニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ベンゾニトリル、シアノピリジン、マロノニトリル、サクシノニトリル、フマロニトリル、ラクトニトリル、3-ヒドロキシプロピオニトリル、アミノアセトニトリル、2-アミノプロピオニトリル、3-アミノプロピオニトリル、2-アミノフェニルプロピオニトリル、2-メチルチオブチオニトリル、フェニルグリシノニトリル、p-ヒドロキシフェニルグリシノニトリル、o-ヒドロキシフェニルグリシノニトリル、2-アミノ-3-ヒドロキシプロピオニトリル、2-アミノ-3-フェニルプロピオニトリル、2-アミノ-4-フェニルブチロニトリル、2-アミノ-3-メチルバレロニトリル、2-アミノ-4-メチルバレロニトリル、2-アミノ-3-ブチロニトリル、2-アミノ-4-メチルチオブチロニトリル、ラクトニトリル、マンデロニトリル、2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリル等を挙げができる。

本発明における微生物触媒を用いた反応は、水性溶媒下で休止菌体反応として実施することが好ましい。また、休止菌体反応の場合、微生物触媒の反応液中濃度は、生産物の種類、微生物触媒の特性により、任意に選択することができ、通常乾燥菌体として、0.1～10.0重量%の範囲から選択されるが、微生物触媒の反応液中の濃度が一定であることが、物質生産コストや生産操作上好ましい。例えば、反応槽から排出した反応液中の微生物触媒を分離回収し、この回収された微生物触媒を再度反応槽に戻すことにより、微生物触媒の反応液中の濃度を一定とすることができます。微生物触媒の製造コストは一般に高価であり、また、微生物触媒の追加により反応槽の微生物触媒濃度が上昇すると、分離機の負担が増加し、微生物触媒反応のコントロールが複雑となる。

微生物触媒反応のpHは、微生物触媒の種類により異なるが、通常pH 5～10の範囲から選択され、反応液に酸やアルカリを添加することにより、反応液のp

Hは所定の一定値に保たれるが、微生物触媒によっては反応中のpHを必ずしも一定に保たなくてもよい場合がある。

本発明において反応温度の昇温コントロールとは、反応温度を昇温することで、微生物触媒の酵素活性を一定にコントロールすることをいい、反応温度を昇温コントロールすることにより、一定速度で物質生産を行うことが可能となる。また、昇温コントロール条件は、酵素活性低下率と反応速度の温度依存率を解析することにより決定することができるが、反応液中の基質濃度や生成物濃度を測定することにより具体的に求めることができる。そして、反応温度の昇温の程度は、微生物触媒の種類や特性及び生産速度維持期間により適宜選択することができるが、通常5～25℃であり、その中でも10～20℃が好ましい。また、微生物触媒反応は、0～50℃、好ましくは20～40℃から選択される温度範囲内の所定の範囲で行われる。

本発明において、一定速度で物質生産を行うとは、反応速度を実質的に一定とし、反応液単位体積当たりの生成物の生産速度を実質的に一定に保持して物質生産を行うことをいい、一定速度で物質生産を行うことにより、工業的に物質生産を行う上で、反応槽あたりの生産量を一定に維持することが可能となり、製品の安定出荷、反応コントロールの簡便さという点できわめて有利である。そして、酵素反応における反応速度は原料（基質）濃度が高い程最大反応速度に近くなるが、原料（基質）が高い程反応液中の残存率も高くなることから、生成物の収率等の生産性の点から原料（基質）濃度を決定することが好ましい。

次に、攪拌型反応槽と分離機を組み合わせた反応装置を用いる場合を例にとって、本発明の微生物触媒を用いた物質生産方法について説明する。反応槽中の水性溶媒に微生物触媒を所定濃度となるように投入し、次いで一定速度で原料基質の添加を開始する。原料基質の添加と同時に反応が始まり、生成物が所望の濃度まで反応液中に蓄積したところで、分離機の運転を開始し、微生物触媒と生成物の分離処理が行われる。分離処理により、回収された微生物触媒は、連続的に反応槽へ全量戻され、一方反応液中の生成物は、一定速度で連続的に系外に排出されていく。この分離処理の開始時には、一定速度での基質の添加を継続すると

同時に、生成物蓄積濃度を一定に維持するための濃度調整用に、水又は有機溶媒含有水溶液からなる水性溶媒を一定速度で添加することが好ましい。

微生物触媒反応を継続する過程で、反応液中の微生物触媒は反応条件に依存したある速度で活性が低下するので、この活性低下分を反応温度を上昇させることで補い、反応温度を昇温コントロールすることが一定速度で物質生産を行う上で必要である。反応温度の昇温コントロールは、分離処理後の生成物含有溶液中の残存基質濃度及び生成物蓄積濃度を、高速液体クロマトグラフィー等により連続的又は間欠的に検知し、この値が一定になるように反応槽の温調システムをプログラムすることにより行われる。反応速度が一定に保てる期間は、微生物触媒の活性低下分が反応温度上昇による反応速度増加で相殺しうる期間継続可能であり、微生物触媒それぞれの特性により異なるが、通常10日～3ヶ月程度である。

また、生成物と微生物触媒の分離に用いられる前記分離機としては、膜分離機や遠心分離機等を用いることができる。生成物と微生物触媒の分離において、生成物が水性溶媒中に溶解している場合は、遠心分離機又は精密ろ過膜や限外ろ過膜等の膜分離機で容易に分離することができる。生成物が水性溶媒中に溶解していない場合は、微生物触媒の粒径と生成物の粒径の中間の孔径を有するろ過膜を使用することにより両者を分離することができる。なお、反応装置としては、上記攪拌型反応槽と分離機を組み合わせたもの他に、攪拌型反応槽と分離機が一体化された膜型リアクター等のプラグフローリアクターも採用することができる。

生成物含有溶液からの生成物の分離は、生成物が水性溶媒に溶解している場合は、例えば水性溶媒を蒸発濃縮することにより、また、生成物が水性溶媒に溶解していない場合は、固液分離機等を用いて行うことができる。さらに、精製が必要な場合は、有機溶媒抽出、蒸留、再結晶等、通常の精製手段を用いて行うことができる。

次に、本発明の微生物触媒を用いた物質生産方法を実生産に適用する場合の物質生産プラントの一例を図1として示す。この物質生産プラントは反応槽1と反応槽1に具備された温調システム2と膜分離機3とろ液貯槽4と洗浄槽5と廃菌体貯槽6と遠心分離機7と複数個のポンプ8と三方弁9とそれらを連結する

配管 10 とから構成されており、前述のように、温調システム 2 によって昇温コントロールができる反応槽 1 と膜分離機 3 で連続反応を行い、膜分離機 3 によりろ液と分離された微生物触媒は回収されて反応槽 1 に戻され、他方ろ液はろ液貯槽 4 に回収される。反応が終了すると、反応液はすべて洗浄槽 5 に移送され、反応液中の微生物触媒は膜分離機 3 によりろ液と分離され、洗浄槽 5 において水洗浄され、洗浄水は上記ろ液と同様にろ液貯槽 4 に回収される。洗浄後の廃菌体は遠心分離機 7 で脱水され、廃菌体貯槽 6 に送られる。

#### 図面の簡単な説明：

第 1 図は、本発明の微生物触媒を用いた物質生産方法を実生産に適用する場合の物質生産プラントを示す模式図である。

第 2 図は、本発明の実施例 1 における 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブタン酸アンモニウム塩の生産速度と反応温度の経時変化を示した図である。

#### 発明を実施するための最良の形態：

以下、実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。なお、生成物の収量は、得られた生成物重量又は生成物を含有する水性溶媒溶液容量を測定し、更に高速液体クロマトグラフィー又はガスクロマトグラフィー等で、残存基質濃度と生成物濃度を測定することにより求めた。アンモニア分は NADH-グルタミン酸脱水素酵素を用いる紫外外部吸光度測定法 (Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer H. U. ed., 3rd ed., vol. 8, pp. 454-461) により定量した。

#### [実施例 1]

限外ろ過 (UF) 膜分離機、自動希釀装置、オートインジェクター付きのオンライン高速液体クロマトグラフィー装置、pH コントローラーを備えた 300 ml 容攪拌型反応槽に、微生物触媒としてあらかじめ培養しておいた *Arthrobacter* sp. NSSC104 の 35% 湿菌体 245.4 g (乾燥重量として 17.2 g) を添加し、さらに水 29.8 ml で希釀した。この反応槽に基質として 2-ヒドロキシ-4

－メチルチオブチロニトリルを 0. 227 g / m i n の速度で連続的に添加し、反応温度 21 °C で反応を開始し、合計で 51. 8 g 加え終わった時点から、水を 0. 945 g / m i n の速度で連続的添加を開始した。

2-ヒドロキシ－4-メチルチオブチロニトリルの 0. 227 g / m i n による連続添加を継続しながら、反応槽から反応液を膜分離機に導き、反応液中の微生物触媒を膜分離機で分離回収して反応槽に戻すと同時に、膜分離機からの透過ろ液を 1. 173 g / m i n の速度で排出した。また反応中を通して、pH を 7. 0 に保つように、28% アンモニア水を添加した。この連続反応の間、生成物である 2-ヒドロキシ－4-メチルチオブタン酸アンモニウム塩の生成速度が一定となるように、2-ヒドロキシ－4-メチルチオブチロニトリルの反応液中濃度をオンライン高速液体クロマトグラフィーにより検知し、約 0. 2 重量% を越えるとその都度反応温度を上昇させ、約 0. 2 重量% になるように昇温コントロールを実施した。かくして、2-ヒドロキシ－4-メチルチオブタン酸アンモニウム塩を約 22 重量% 含有する膜透過ろ液が、上記一定速度で排出され、27 日間の連続反応を通じて、全量で 47. 3 kg の膜透過ろ液を回収した。また、反応温度は最終日までに 14 °C 昇温して 35 °C となっていた。生産速度と反応温度の経時変化を図 2 に示す。

この 27 日間の連続反応終了後、反応槽及び反応配管系に存在する滞留液を膜濃縮洗浄し、534. 5 g の洗浄膜透過ろ液を別途回収した。高速液体クロマトグラフィーにより、連続反応中に得られた膜透過ろ液及び別途回収した洗浄膜透過ろ液中の、基質である 2-ヒドロキシ－4-メチルチオブチロニトリルの濃度を分析したところ、それぞれ 0. 25 重量% 及び 0. 12 重量% 残存し、同様に生成物である 2-ヒドロキシ－4-メチルチオブタン酸の濃度を分析したところ、それぞれ 20. 00 重量% 及び 9. 35 重量% 存在し、また同様に副生物である 2-ヒドロキシ－4-メチルチオブタン酸アミドの濃度を分析したところ、それぞれ 0. 07 重量% 及び 0. 03 重量% 存在していた。用いた基質 2-ヒドロキシ－4-メチルチオブチロニトリルの純度が 95. 0 重量% であったところから、生成物のモル収率及び基質の残存率を計算すると、それぞれ 95. 0 % 及び

1. 35 %であった。なお、膜透過ろ液及び洗浄膜透過ろ液中のアンモニア分を酵素法で測定したところ、それぞれ 2.28 重量% 及び 1.07 重量% であった。

上記で得られた膜透過ろ液及び洗浄膜透過ろ液を合体し、10 分の 1 量のトルエンで洗浄した後、水層部分をロータリーエバポレーターを用いて、50 ~ 70 mmHg、バス温 50 °C で、13.5 kg まで濃縮した。この濃縮液を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、基質である 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルが 0.06 重量% 残存し、生成物である 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブタン酸が 70.44 重量% 存在し、副生物として 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブタン酸アミドが 0.23 重量%、2-ヒドロキシ-4-メチルチオブタン酸の 2 分子縮合エステル体である鎖状ダイマーが 0.15 重量% 存在した。この濃縮後における、生成物のモル収率及び基質の残存率を計算すると、95.0% 及び 0.09% であった。なお、アンモニア分は酵素法で測定したところ、7.18 重量% であった。この値から、基質の 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルは濃縮操作で分解留去することが確認された。

#### 産業上の利用可能性：

本発明によると、高価な微生物触媒を新たに追加することなく、反応開始時に添加した微生物触媒を全量回収し、反応温度の昇温コントロールにより、反応槽あたりの生成物生産速度を長期間一定に維持することができ、高価な微生物触媒を有効に利用し、有用物質を高収率で生産することができるばかりでなく、工業的に有利な安定生産を実現することができる。

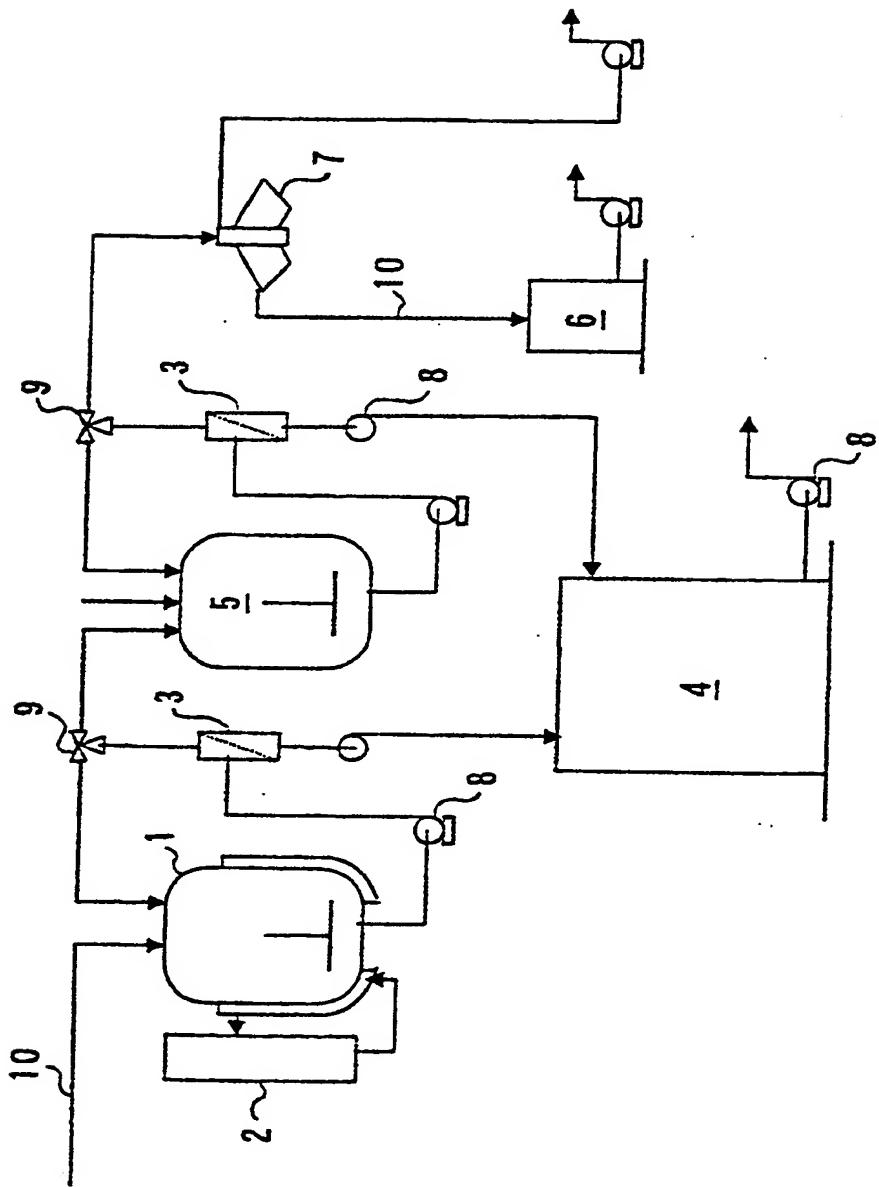
## 請求の範囲

1. 微生物触媒を用いた反応において、反応温度を昇温コントロールすることにより、一定速度で物質生産を行うことを特徴とする微生物触媒を用いた物質生産方法。
2. 微生物触媒を用いた反応において、微生物触媒の基質を一定速度で添加し、反応温度を昇温コントロールすることにより、一定速度で物質生産を行うことを特徴とする微生物触媒を用いた物質生産方法。
3. 微生物触媒の反応液中の濃度が一定であることを特徴とする請求項1又は2記載の微生物触媒を用いた物質生産方法。
4. 微生物触媒の反応液中の濃度を一定とするために、反応槽から排出した反応液中の微生物触媒を分離回収し、再度反応槽に戻すことを特徴とする請求項3記載の微生物触媒を用いた物質生産方法。
5. 昇温が5～25℃から選択される温度範囲であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の微生物触媒を用いた物質生産方法。
6. 微生物触媒がニトリラーゼ発現微生物触媒であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の微生物触媒を用いた物質生産方法。
7. ニトリラーゼ発現微生物がアースロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物であることを特徴とする請求項6記載の微生物触媒を用いた物質生産方法。
8. 微生物触媒を用いた反応が、一般式  $RCN$  (式中、Rは、水素原子、置換基を有してもよい $C_1$ ～ $C_6$ のアルキル基、置換基を有してもよい $C_2$ ～ $C_6$ のアルケニル基、置換基を有してもよいアリール基、又は置換基を有してもよい複素環基を示す。) で表されるニトリル化合物を、微生物の触媒作用により水性溶媒中で加水分解して、一般式  $RCO NH_2$  (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表されるアミド化合物、又は一般式  $RCOOH$  (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表されるカルボン酸ないしはそのアンモニウム塩化合物に変換する反応であることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載の微生物触媒を用いた物質生産方法。
9. 微生物触媒を用いた反応が、一般式  $R'CH(OH)CN$  (式中、R'は、

水素原子、置換基を有してもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルキル基、置換基を有してもよい  $C_2 \sim C_6$  のアルケニル基、置換基を有してもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルコキシ基、置換基を有してもよいアリール基、置換基を有してもよいアリールオキシ基又は置換基を有してもよい複素環基を示す。) で表される  $\alpha$ -ヒドロキシニトリル化合物を微生物の触媒作用により水性溶媒中で加水分解して、一般式  $R' \text{CH(OH)CONH}_2$  (式中、  $R'$  は前記と同一の意味を示す。) で表される  $\alpha$ -ヒドロキシ酸アミド化合物、又は一般式  $R' \text{CH(OH)COOH}$  (式中、  $R'$  は前記と同一の意味を示す。) で表される  $\alpha$ -ヒドロキシ酸ないしはそのアンモニウム塩化合物に変換する反応であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載の微生物触媒を用いた物質生産方法。

10. 微生物触媒を用いた反応が、一般式  $R'' \text{CH(NH}_2\text{)CN}$  (式中、  $R''$  は、水素原子、置換基を有してもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルキル基、置換基を有してもよい  $C_2 \sim C_6$  のアルケニル基、置換基を有してもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルコキシ基、置換基を有してもよいアリール基、置換基を有してもよいアリールオキシ基又は置換基を有してもよい複素環基を示す。) で表される  $\alpha$ -アミノニトリル化合物を微生物の触媒作用により水性溶媒中で加水分解して、一般式  $R'' \text{CH(NH}_2\text{)CONH}_2$  (式中、  $R''$  は前記と同一の意味を示す。) で表される  $\alpha$ -アミノアミド化合物、又は一般式  $R'' \text{CH(NH}_2\text{)COOH}$  (式中、  $R''$  は前記と同一の意味を示す。) で表される  $\alpha$ -アミノ酸ないしはそのアンモニウム塩化合物に変換する反応であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載の微生物触媒を用いた物質生産方法。

第1図





第2図

